

Aus der Fachrichtung Experimentelle Therapie und Funktionelle Pathologie
im Institut für morphologische und funktionelle Veterinär-Pathologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Untersuchung
über die in vitro-Retraktion des Gerinnsels vom Hund bei
unterschiedlichem Thrombocytengehalt des Testplasmas

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
W o l f h a r d R e u t e r
Tierarzt aus Rogasen

Berlin 1976
Journal-Nr. 879

der Fachrichtung Experimentelle Therapie und Funktionelle Pathologie
Institut für morphologische und funktionelle Veterinär-Pathologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Untersuchung

Über die in vitro-Retraktion des Gerinnsels vom Hund bei
unterschiedlichem Thrombocytengehalt des Testplasmas

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
W o l f h a r d R e u t e r
Tierarzt aus Rogasen

Berlin 1976
Journal-Nr. 879

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Vorsitzender des FBR: Prof. Dr. H. Loppnow

Referent: Prof. Dr. H. Niepage

Korreferent: Prof. Dr. H. Krzywanek



Tag der Promotion: 11. Juni 1976

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I Einleitung.....	4
II Schrifttum.....	5
1) Geschichtliches.....	5
2) Thrombocyten.....	7
3) Gerinnselretraktion.....	11
III Eigene Untersuchungen.....	17
A Material und Methode.....	17
1) Versuchstiere.....	17
2) Gewinnung des Blutes.....	18
3) Gewinnung von Testplasma.....	19
4) Thrombocytenzählung.....	19
5) Ablauf des Versuches.....	20
B Ergebnisse.....	24
1) Fehler der Methode.....	24
2) Beziehung zwischen Thrombocytenzahl und Retraktionsergebnis.....	26
IV Besprechung.....	28
V Zusammenfassung.....	34
VI Literaturverzeichnis.....	36

I. EINLEITUNG

Seit den ältesten Zeiten ist den Menschen die Blutgerinnung als ein merkwürdiger, heilsamer Vorgang bewußt. Die Erforschung dieses Phänomens hat, nachdem die naturwissenschaftliche Betrachtungsweise der Welt sich durchgesetzt hatte, dennoch lange auf sich warten lassen. Erst im jetzigen Jahrhundert gewinnt die Forschung auf diesem Gebiet an Boden, nicht zuletzt, weil die Kehrseite dieses Heilvorganges, die Gefahr der Thrombose, an Bedeutung gewonnen hat.

Was bei der Gerinnung im einzelnen vor sich geht, ist überwiegend durch in vitro-Versuche erkannt worden. Man wird die dabei gewonnenen Vorstellungen nicht ohne weiteres auf die Vorgänge in oder am Gefäßsystem übertragen dürfen. Für die Prüfung der verschiedenen an der Gerinnung beteiligten Faktoren zur Beurteilung von Gerinnungsübeln an Patienten kommen jedoch vor allem in vitro-Methoden in Frage. Deshalb ist es notwendig, die Gerinnungsphasen einzeln, bei standardisierten Bedingungen, unter Verwendung von Thrombocyten oder Blutplasma von normalen Probanden genau zu kennen, um sie mit entsprechenden Befunden bei einem Patienten vergleichen zu können.

In der Veterinärmedizin ist die Anwendung der Gerinnungsuntersuchung noch rudimentär. Wegen der verschiedenen Tierarten können die am Menschen gewonnenen Erfahrungen nicht einfach übernommen werden. Grundlagenforschung ist erforderlich, um die in der Humanmedizin entwickelten Untersuchungsverfahren auf ihre Brauchbarkeit am Tier, sei es im klinischen Bereich oder im Tierexperiment, zu prüfen. Durch die Untersuchung der in vitro-Retraktion des Gerinnsels am Plasma vom Hund wird versucht, einen Beitrag zu leisten.

II. S C H R I F T T U M

Die Retraktion des Gerinnsels ist ein Teil der Blutgerinnung. Schon im A l t e r t u m hatte man an dem beim Aderlaß aufgefangenen Blut die Erfahrung gewonnen, daß nach der Gerinnung, bei der das Blut zunächst als Ganzes erstarrte, durch Zusammenziehung des "festen" Blutanteils die Blutflüssigkeit herausgepreßt wurde.

Mit dem Aufkommen der N a t u r w i s s e n s c h a f t wurde die Blutgerinnung zu einem Forschungsobjekt, das bis heute seinen wissenschaftlichen Abschluß nicht gefunden hat.

HEWSON stellte 1772 fest, daß die Geschwindigkeit der Trennung von Serum und Crassamentum (Blutkuchen) von der Temperatur abhängig ist. Er hielt die Körpertemperatur für die optimale Voraussetzung. 1819 beschrieb THACKRAH eine Methode, das ausgepreßte Serum quantitativ zu erfassen. Er berechnete die Gewichts Differenz zwischen dem das Koagulum enthaltenden Gefäß vor und nach Abgießen des Serums. Nach THACKRAH beschleunigt die Temperatur die Retraktion bis zu 49°C (120°F), weitere Steigerung der Temperatur verzögert die Auspressung des Serums.

Die Bezeichnung Retraktion stammt von SCHKLAREWSKI, der 1868 unter dem Mikroskop im Kapillarröhrchen beobachtete, wie sich das Gerinnsel von der Wand retrahierte.

BIZZOZERO (1882) erkannte als erster, daß die Blutplättchen, deren Entdeckung DONNE (1842) zugeschrieben wird, Blutbestandteile eigener Art und nicht etwa Zerfallsprodukte anderer Blutzellen sind und eine Bedeutung für die Blutgerinnung haben.

Die morphologischen Veränderungen der Blutplättchen im Verlauf des Gerinnungsvorgangs wurden von EBERT und SCHIMMELBUSCH 1885 beschrieben und als "visköse Metamorphose" bezeichnet. Die Entdeckung des "Fibrinfermentes" durch SCHMIDT (1872), das später von ihm Thrombin genannt wurde, bildete die Grundlage für die Gerinnungsforschung am Ende des 19. Jahrhunderts.

MORAWITZ faßte 1905 die Erkenntnisse der damaligen Zeit in seinem klassisch gewordenen Zwei-Phasen- oder Vier-Faktoren-Schema zusammen, welches nahezu 50 Jahre Gültigkeit behielt.

In der folgenden Zeit geriet die Erforschung der Retraktion in den Hintergrund gegenüber den zahlreichen Untersuchungen, die sich mit den für die Gerinnung bedeutsamen **P l a s m a f a k t o r e n** befaßten. Sie haben zu komplizierten Vorstellungen über den Ablauf der Gerinnung geführt, wie sie in der von MACFARLANE (1964) und DAVIE und RATNOFF (1964) unabhängig entwickelten "Kaskaden" - oder "Wasserfalltheorie" zum Ausdruck kommt. Danach wird der Gerinnungsablauf als ein schrittweiser enzymatischer Prozeß angesehen, bei dem jeder Gerinnungsfaktor als inaktiver Vorläufer im Plasma vorhanden ist. Durch Aktivierung entsteht jeweils ein Enzym, welches das im Ablauf folgende Proenzym aktiviert.

Die gesamte "Kaskade" wird durch Oberflächenkontakt in Gang gesetzt, wobei der kontaktsensible Faktor XII durch Phospholipide aus Thrombocyten (Plättchenfaktor 3) oder Erythrocyten (in vitro Kollagen oder Glasoberflächen) aktiviert wird (intrinsic system), während die Gerinnung bei Gewebsverletzung (extrinsic system) durch das Zusammenwirken von Phospholipiden mit dem sogenannten Gewebefaktor, Faktor VII und Ca^{++} ausgelöst wird. Beide Systeme führen zur Aktivierung des Faktors X, der als Komplex mit Faktor V, Phospholipiden, Ca^{++} und Prothrombin (Faktor II) in das bei der Fibrinogen/Fibrinumwandlung wirksame Thrombin überführt.

Die Gültigkeit des Kaskadensystems ist hypothetisch, da die Existenz aktivierter Faktoren nicht in jedem Fall nachgewiesen ist. Nach SEEGER (1965) ist Prothrombin ein Komplexmolekül, und die Faktoren VII, IX und X sind Abkömmlinge desselben.

Unabhängig von den Einzelheiten werden die von MORAWITZ aufgestellten 2 Gerinnungsphasen, die die Aktivierung des Prothrombins und die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin

betrafen, heute ergänzt durch die Retraktionsphase und die Fibrinolyse.

Im Zusammenhang mit den vorgelegten Untersuchungen gilt der R e t r a k t i o n s p h a s e besondere Aufmerksamkeit.

Die Retraktion des Gerinnsels erfolgt durch das Zusammenwirken von Blutplättchen und Fibrin in einem geeigneten Ionenmilieu. Da neben der Plättchenzahl der Plättchenfunktion Bedeutung für den Ablauf der Reaktion zukommt, werden in vitro-Retraktionstests in der Medizin zur Prüfung der Thrombocytenfunktion eingesetzt.

Die Literatur über die T h r o m b o c y t e n ist heute bereits unüberschaubar umfangreich. Hier können nur grundlegende Befunde dargestellt werden, wobei den Untersuchungsergebnissen am Hund besondere Beachtung geschenkt wird.

Die Bezeichnung Thrombo c y t e n stammt von DEKHUYZEN (1901). Sie hat sich eingebürgert, obwohl seit WRIGHT (1906) bekannt ist, daß die Blutplättchen der Säugetiere ein Zellprodukt darstellen. WRIGHT erkannte ihre Herkunft aus bestimmten Riesenzellen des Knochenmarkes und der Milz, die von HOWELL (1891) zum Unterschied von den Osteoklasten als Megakaryocyten bezeichnet wurden (BOROVICZÉNY, SCHIPPERGES, SEIDLER, 1974).

Megakaryocyten entstehen aus Megakaryoblasten, Zellen, die im Vergleich zu den übrigen im Knochenmark vorkommenden Blasten (Myeloblasten, Proerythroblasten) größer sind, jedoch wie diese einen stark basophilen Cytoplasmaleib besitzen. Die Entwicklung zum Megakaryocyten erfolgt durch Kernteilung ohne Teilung des Cytoplasmas, so daß eine an Größe zunehmende, vielkernige Zelle entsteht (Polyploidie, $4n - 32n$). Mit zunehmender Reife verliert das Cytoplasma an Basophilie; es färbt sich im Pappenheimpräparat blau-rötlich an und läßt nach einiger Zeit sogenannte Plättchenfelder erkennen, von denen aus sich schließlich die Blutplättchen absondern, um in den Kreislauf zu gelangen.

Schon 1938 entdeckten HOWELL und DONAHUE Megakaryocyten in den Lungenkapillaren von Hunden.

KAUFMANN, AIRO, POLLACK, CROSBY und DOBERNECK (1965) stellten fest, daß $1/5 - 1/3$ der zirkulierenden Plättchen aus den Megakaryocyten der Lungen stammen.

Die Zahl der Thrombocyten pro μl Blut schwankt bei allen untersuchten Tierarten erheblich. Für den Hund werden überwiegend Werte zwischen 150 000 und 500 000 als normal angesehen. Wie aus der Verteilung der in der Literatur für den Hund angegebenen Normalwerte hervorgeht, ist in Zuständen besonderer Reizung eher mit höheren als mit niedrigeren Thrombocytenzahlen zu rechnen (NIEPAGE, 1976). HALL (1972) fand bei normaler Trächtigkeit der Hündin erhöhte Werte. Für den Gerinnungsablauf ist die Zahl der Thrombocyten erst von Bedeutung, wenn sie unter einen kritischen Punkt sinkt, der beim Hund bei Thrombocytenzahlen unter 100 000/ μl angesetzt wird (MERCK VETERINARY MANUAL, 1973).

Die Lebensdauer der Thrombocyten im Kreislauf beträgt beim Hund nach HALL (1972) 8 - 12 Tage.

Eine Übersicht über die Morphologie der Blutplättchen, die die Literatur bis 1970 berücksichtigt, gibt v. SCHAEWEN (1971). Schon BIZZOZERO (1882) beschrieb die Plättchen ("Piastrine") als linsenförmige Scheibchen, die aus einer hyalinen Substanz mit rötlich anfärbbaren Körnchen bestehen. Inzwischen wird ein zentrales, sich mit basischen Farbstoffen rötlich-violett anfärbendes Granulomer vom peripheren, mehr bläulichen Hyalomere unterschieden. Beim Hund sind rundliche Plättchen die Regel; als Durchmesser der Hundethrombocyten wird am häufigsten 2,1 - 3,5 μm angegeben mit einer Schwankungsbreite von 0,8 - 10 μm , in die auch sogenannte Riesenplättchen eingeschlossen sind.

Elektronenmikroskopisch (Literatur s. v. SCHAEWEN) wurde eine dreischichtige Membran aus zwei Proteinlagen mit dazwischen liegender Lipoidschicht festgestellt. Außen um die Membran (Dicke 45 - 80 Å) befindet sich eine etwa 500 Å starke amorphe Zone.

Im H y a l o m e r , das homogen oder fein granuliert ist, kommen sogenannte Mikrotubuli vor. Ein Teil von ihnen bildet ein marginales Bündel, von dem aus einzelne Tubuli bogenförmig in das Innere des Plättchens eindringen. Möglicherweise sind sie Träger des aktomyosinähnlichen Thrombosthenins und haben kontraktile Eigenschaften. Zwischen Zellmembran und marginalem Bündel befinden sich kreuzweise verspannte Filamente.

Das G r a n u l o m e r besteht aus zahlreichen Körnchen und Bläschen. Man kann 5 verschiedene Arten von G r a n u l a unterscheiden, die nach der Reihenfolge des griechischen Alphabets bezeichnet werden:

Die α -Granula können Fibrin enthalten; das β -Granulomer entspricht den Mitochondrien. Als γ -Granulomer wird ein Mikrosystem von Bläschen, Vakuolen und Tubuli bezeichnet, die z. T. wahrscheinlich durch Pinocytose entstehen. Wegen ihres Eisengehaltes werden die σ -Granula auch Siderosomen genannt. Das ε -Granulomer besteht aus Glykogenpartikeln. JAIN (1975) untersuchte u. a. auch Hundethrombocyten im Rasterelektronenmikroskop und fand zwei verschiedene Formen. Die Mehrheit der Plättchen war scheibenförmig, oval oder länglich und leicht bikonkav mit rauher Oberfläche. Die zweite Gruppe bestand aus unregelmäßig kugelförmigen Gebilden, die Lücken auf der Oberfläche aufwiesen.

Die R e g u l a t i o n der Plättchenproduktion ist noch nicht sicher geklärt. Vielfach wird vermutet, daß in Analogie zum Erythropoetin, dem Hormon der Erythrocytenproduktion, ein Thrombopoetin die Stammzellen stimuliert. Da sich in Versuchen an Hunden und Kaninchen durch Reizung des Vagus und des Sympathicus Änderungen in der Thrombocytenzahl im Blut hervorrufen ließen, nehmen IWANITZKY, VASILENKO und KLIMOVA (1938) eine neurogene Steuerung der Thrombocytenzahl an. Gesichert ist, daß durch eine künstlich herbeigeführte Thrombocytopenie eine Vermehrung der Plättchenzahl und durch Thrombocytose eine Verminderung der Thrombocytenzahl hervorgerufen wird (HARDISTY, 1974). Es scheint eine Abhängigkeit zwischen der Zahl der Kerne eines Megakaryocyten und der Zahl der produzierten Plättchen zu bestehen.

Nach HARKER und FINCH (1969) werden pro Tag und Kerneinheit 50 ± 10 Plättchen produziert.

Für den Gerinnungsablauf ist die Funktion der sogenannten Plättchenfaktoren der Thrombocyten neben anderen chemisch wirksamen Inhaltsstoffen von Bedeutung.

Plättchenfaktor 1 ist nach HJORT, RAPAPORT und OWREN (1955) der auf der Plättchenoberfläche adsorbierte Plasmafaktor V, der als Cofaktor von Faktor X für die Aktivierung des Prothrombins wichtig ist. Der Plättchenfaktor 2 ist wahrscheinlich bei der Umwandlung des Fibrinogens durch Thrombin beschleunigend wirksam.

Plättchenfaktor 3 stellt nach HARDISTY und HUTTON (1966) sowie SPAET und CINTRON (1965) einen Komplex verschiedener Lipoproteide dar. In Micellarform vorliegend liegt deren Bedeutung in der besonderen Gruppierung oberflächenaktiver Gruppen, mit denen sie Ca^{++} und die Gerinnungsfaktoren adsorbieren. Sie dienen somit als Medium zur Konzentration von Gerinnungsfaktoren (BANG, BELLER, DEUTSCH und MAMMEN, 1971).

Erst nach der Plättchenadhäsion oder -aggregation sind die Plättchenlipide am Bindegewebe verfügbar. Nach WHITE und KRIVIT (1966) sind diese Phospholipide in den Granula lokalisiert, durch ihre Freisetzung gelangen sie in den Gerinnungsprozess. HARDISTY (1974) nimmt ihren Sitz auf der Oberfläche der Membran an. Plättchenfaktor 4 kann Heparin neutralisieren, er wird während der Freisetzungsreaktion nach außen abgegeben und entspricht in der Wirkung dem Antithrombin VI.

Im Verlauf der Gerinnung machen die Thrombocyten die erwähnte "visköse Metamorphose" durch. Sie läßt sich in verschiedene Stadien unterteilen, die als Adhäsion, Schwellung, Aggregation, Ausbildung von Pseudopodien und Ausbreitung unterschieden werden, jedoch nicht gleichzeitig an allen Plättchen ablaufen. Eine ausführliche Übersicht und Literaturangaben gibt v. SCHAEWEN, 1971.

Im Haftpräparat wurde beobachtet, daß der Thrombocyt etwa 1 min nach der Blutentnahme schwillt und zunächst kurze,

später bis zum Zehnfachen des Zelldurchmessers sich erstreckende Pseudopodien aussendet, die sich z. T. verästeln. Sie dienen der Anheftung und der Aufnahme von Verbindungen zu benachbarten Plättchen.

Bei der folgenden Ausbreitung kann das Plättchen das Zehnfache seiner ursprünglichen Fläche einnehmen. Nicht jedes Plättchen durchläuft alle Phasen.

Die bei der anschließenden Auflösung des Plättchens beobachtete Ausbildung eines "Plasmaringes" beruht auf dem Austritt von einzelnen oder multiplen Bläschen aus dem Inneren des Thrombocyten. Es handelt sich dabei um Sekretionsprodukte der α -Granula, die so den Plättchenfaktor 3 ins Plasma bringen. Der Durchtritt verursacht in der Membran Löcher, die schließlich zur Zerstörung der Membran führen.

Zur viskösen Metamorphose zählt auch die Einbettung der Plättchen in das entstehende Fibrinnetz.

Ausgelöst durch Thrombin, welches die Plättchenausbreitung und die Auflösung der Granula fördert, wird durch Freisetzung des Plättchenfaktors 3 aus dem zuerst auf die Thrombocytenoberfläche beschränkten Prozess ein plasmatischer. Wenige Sekunden nach der Blutentnahme liegt das Fibrinogen in Form perlschnurartiger Ketten aus 4 - 5 Fibrinogenmolekülen linear aggregiert vor. Durch End-zu-Endlagerung entstehen die intermediären Fibrinogenketten (bis zu 30 Moleküle), die unter Einwirkung einer noch unbekannten Thrombocytensubstanz sich durch Lateralessoziation in Fibrinfasern umwandeln. Thrombin aktiviert diesen Vorgang.

Das entstehende Fasernetz, in das auch Erythrocyten eingeschlossen werden, nimmt seinen Ausgang vom erhalten gebliebenen Granulaanteil mancher Thrombocyten. Die nun folgende Retraktion ist an die Gegenwart intakt gebliebener, rosettenförmige Aggregate bildender Plättchen gebunden, in deren Granula Mikrofilamente während der Phase der aktivsten Gerinnselretraktion festgestellt wurden.

JÜRGENS(1959) läßt nach kritischer Besprechung der bestehenden Theorien über den Retraktionsmechanismus noch 2 Möglichkeiten gelten.

Entweder wird der Retraktionsvorgang als Aggregation des Fibrinmoleküls mit der Seit-an-Seit-Anlagerung der Fibrinmicellen angesehen oder die aktive Pseudopodien-Kontraktion der Thrombocytenausläufer wird als wesentlich angenommen. BREDDIN (1968) nimmt an, daß sich von den Thrombocyten freigesetztes Thrombosthenin zusammen mit ATP während der Retraktion zusammenzieht und dadurch eine Bündelung und Anlagerung der Fibrinfasern bewirkt. Eine ähnliche Meinung vertritt HARDISTY (1964), der meint, daß die Retraktion durch die Kontraktion der Mikrofibrillen in den Pseudopodien der Plättchen, die mit den Fibrinfäden in Verbindung stehen, zustande kommt.

Während über die morphologischen Veränderungen der Thrombocyten beim Gerinnungsvorgang ziemlich übereinstimmende Vorstellungen bestehen, herrscht über die physiko-chemischen Bedingungen noch keine völlige Klarheit.

Für das Zustandekommen der Adhäsion werden die Anziehung konträrer elektrischer Ladungen oder eine gesteigerte Klebrigkeit der Plättchen diskutiert. Die Freisetzungsreaktion beginnt, sobald die Plättchen Kontakt mit Kollagen bekommen. Die Aggregation der Plättchen entsteht aus dem Zusammenwirken von Fibrinogen und Adenosindiphosphat (ADP), das aus dem verletzten Gewebe, den Erythrocyten und vor allem den Plättchen selbst freigesetzt wird. Die bisher allgemein angenommene zentrale Stellung des ADP wird allerdings von MACFARLANE und MILLS (1975) bestritten.

Die physiologische Bedeutung der Gerinnselretraktion wurde anfangs in der Annäherung der Wundränder gesehen und als "physiologische Ligatur" bezeichnet (JÜRGENS, 1959).

Demgegenüber kam BUDTZ-OLSEN (1951) auf Grund seiner Versuche zu der Überzeugung, daß die Retraktionskraft für eine Annäherung der Wundränder zu gering sei. Er hielt den Vorgang für ein "phylogenetisches Relikt". Nach HARTERT und JÜRGENS (1959) liegt die Bedeutung der Retraktion in einer Rekanalisation der Gefäße. Eine Verfestigung des Plättchenpfropfes bewiesen HOVIG, ROWSELL, DODDS, JØRGENSEN und MUSTARD (1967) in Versuchen an Mesenterialgefäßen des Hundes.

Die Bedeutung der Thrombocyten für die Aufrechterhaltung einer intakten Gefäßwand hebt FROST (1971) hervor. Aus der Untersuchung von arteriellen Gefäßinnenflächen des Kaninchens mit dem Rasterelektronenmikroskop erkannte er, daß sich an das durch Reize verschiedener Art gestörte Endothelgefüge Thrombocyten anlagerten und daß hier durch Fibrinbildung weitere korpuskuläre Blutelemente eingeschlossen wurden.

Die sofortige Reaktion der Thrombocyten auf eine Endothelverletzung wird auch als Antigen (Endothel) - Antikörper (Thrombocyten) - Reaktion interpretiert (HALL, 1972). Zur Untersuchung der Retraktion des Gerinnsels sind zahlreiche Methoden entwickelt worden. Dabei mußten die Einflüsse verschiedener Faktoren auf den Retraktionsversuch berücksichtigt werden. Eine Übersicht über die bis 1950 üblichen Verfahren findet sich bei BUDTZ-OLSEN (1951).

Die Temperatur beschleunigt zwischen 5° und 40°C die Retraktion stark, ohne daß deshalb das Ausmaß der Retraktion wesentlich größer wird (BUDTZ-OLSEN, 1951, MACFARLANE, 1938, SCHNEIDER, 1955). Die physiologische Körpertemperatur gilt als optimal.

Die Grenzwerte des für den Retraktionsversuch erforderlichen osmotischen Druckes werden nach BENTHAUS (1959) durch NaCl-Lösungen von 0,35 und 2,2 % bestimmt. Das Optimum liegt bei einer Konzentration von 0,85 %.

Innerhalb eines pH - Bereiches von 7 - 8 wird nach BUDTZ-OLSEN die Retraktion nicht beeinflusst. ELLICOT (1951) hält pH-Werte zwischen 5,12 und 8,15 für geeignet. Nach BENNEWITZ (1955) ist pH 6,6 als Optimum anzusehen.

Da das Serum in den Maschen des Fibrinnetzes nur durch die Kapillarkraft festgehalten wird, läßt es sich durch Einwirkung der Schwerkraft herausziehen. Ist der Fibrinanteil gering und die Maschenweite dementsprechend groß, so wird die Kapillarkraft klein. Unter diesen Umständen fließt mehr Serum ab als unter physiologischen Bedingungen.

BENTHAUS (1959) lehnt deshalb Methoden ab, bei denen das Serum durch Abtropfen oder durch mehrmaliges Abgießen gewonnen wird.

Von wesentlichem Einfluß auf das Ergebnis des Retraktionsversuches ist die Beschaffenheit der verwendeten Glasware. BABINGTON zeigte schon 1830, daß bei unterschiedlichen Oberflächen der Gefäße verschiedene Serummengen ausgepreßt werden. LE SOURD und PAGNIEZ (1907) glühten die Gläser aus und spülten mit Wasser nach. BUDTZ-OLSEN verglich Gefäße, die durch Ausglühen oder durch Abdecken mit Wachs oder flüssigem Paraffin vorbehandelt waren, und kam dabei zu Abweichungen bis zu 50 % des Serumvolumens. Durch JAKES, FIDLAR, FELDSTEDT und MACDONALD (1946) wurden silikonisierte Röhrchen eingeführt, die heute überwiegend benutzt werden.

Zu Anfang wurden Kapillarröhrchen, Uhrgläser oder Reagenzgläser für den Retraktionsversuch gebraucht. Nach OPITZ und MATZDORF (1921) besteht eine Beziehung zwischen dem Lumen des verwendeten Röhrchens und der Serumausbeute. Es ist daher notwendig, die Maße der Teströhrchen anzugeben.

Wird die Retraktionsbestimmung an Vollblut durchgeführt, so werden die roten und weißen Blutkörperchen bei der Retraktion des Fibrinnetzes in dieses mit eingeschlossen. Sie beeinflussen durch ihre Zahl und ihr Volumen die Größe des Gerinnsels und die Menge des ausgepreßten Serums. Bei der Auswertung müssen daher die Volumina von Zellen, Serum und Fibrin in Beziehung zueinander gesetzt werden. (s. z. B. AGGELER, LUCIA und HAMLIN (1942); MACFARLANE (1938)). Bei Verwendung eines plättchenreichen Citratplasmas entfällt diese Komplizierung der Auswertung.

Zur Bestimmung der Retraktion gibt es verschiedene Verfahren, die sich grundsätzlich danach unterscheiden, welcher Teilaspekt des Retraktionsvorganges gemessen werden soll. Es kann die ausgepreßte Menge an Serum, die Größe des Gerinnsels, die Retraktionszeit, die Retraktionskraft oder die Gerinnsel-festigkeit geprüft werden.

Die Messung des Serumvolumens führte MACFARLANE (1939) durch, indem er 5 ml venöses Blut in ein graduiertes Röhrchen gab, in das vom Stopfen aus ein Glasstab hineinreichte. Nach 1 h im Wasserbad bei 37°C wird der Glasstab mit dem daran hängenden Gerinnsel herausgenommen und das Serumvolumen an der Graduierung abgelesen.

BREDDIN (1968) verwendet statt des Vollblutes ein plättchenreiches Plasma, das mit Normalplasma gemischt wird. Dadurch entfällt die Berücksichtigung von Blutzell- und Fibringehalt. Das retrahierte Gerinnsel wird aus dem Röhrchen entfernt und das zurückgebliebene Serum in einem Meßzylinder gemessen.

Die Messung der Gerinnselmenge erfolgt nach BETTEX-GALLAND und LÜSCHER (1960), indem plättchenreiches Plasma mit CaCl_2 und Thrombin versetzt 1 h im Wasserbad bei 37°C belassen wird. Durch Herausnehmen des Gerinnsels zu verschiedenen Zeiten und Abmessung seiner Länge kann der Retraktionsverlauf graphisch wiedergegeben werden. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, daß durch das wiederholte Herausnehmen des Gerinnsels mechanisch die Serumausbeute größer wird als es bei ungestörter Retraktion der Fall wäre.

BENTHAUS (1959) versetzt plättchenreiches Plasma mit CaCl_2 , Thromboplastin und 0,85 %iger NaCl-Lösung und läßt die Probe im graduierten Röhrchen 12 h im Wasserbad bei 37°C. Nach Feststellung der Länge des Gerinnsels an der Graduierung wird dessen Volumen mit einer besonderen Formel berechnet.

KRISTENSON (1932) bestimmt die Retraktionskraft mit einer komplizierten Versuchsanordnung. FONIO (1954) (a) ermittelte, wieviele Stahlkugeln vom Koagulum angehoben werden konnten. Mit einer Federwaage bestimmten BAYERLE, MARX und HELL (1949) die Retraktionskraft. Dabei wird Blut in eine Schale gegeben. Ein mit einer Federwaage verbundener Plastikstempel wird so über die Blutoberfläche gehängt, daß er durch Adhäsion anhaftet. Durch Einbeziehung in das Fibrinnetz wird der Stempel im Verlauf der Retraktion (2 h) nach unten gezogen; die Kraft ist an der Federwaage abzulesen. Mit dieser Methode bestimmte WEBER (1969) die Retraktion beim Pferd und beim Hund.

Bei der Thrombelastographie nach HARTERT (1948) wird das Retraktionsvermögen des Gerinnsels über die G e r i n n - s e l f e s t i g k e i t indirekt gemessen. In eine in Drehpendelbewegung versetzte Blutprobe taucht ein torsionselastisch aufgehängter Stift, der in das entstehende Gerinnsel einbezogen wird und der Küvettenbewegung um so enger folgt, je fester das Gerinnsel wird. Durch photographische Registrierung läßt sich u. a. das Maximum der Gerinnselfestigkeit als Maximalamplitude bestimmen.

III. E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

A. Material und Methoden

Als Versuchstiere standen mir 15 instituts-eigene Hunde zur Verfügung. Die Hunde werden in Boxen mit Auslauf gehalten und mit Altromin* und teilweise zusätzlich mit Fleischkonserven gefüttert. Während der gesamten Untersuchungszeit waren die Tiere als klinisch gesund anzusehen.

Die Hunde im einzelnen:

Hund 1	Rüde	Schäferhundbastard	6 Jahre
" 2	"	"	6 "
" 3	"	"	6 "
" 4	"	"	6 "
" 5	Hündin	"	6 "
" 6	"	"	6 "
" 7	"	Bullterrier	4 "
" 8	Rüde	Beagle	10 "
" 9	Hündin	"	10 "
" 10	"	"	8 "
" 11	Rüde	"	2 "
" 12	Hündin	"	2 "
" 13	"	"	2 "
" 14	"	"	2 "
" 15	"	"	2 "

Die Nrn. 1 - 5 sowie die Nrn. 11 - 15 sind Wurfgeschwister.

Zur Retraktionsmessung wurde die Methode nach BREDDIN (1968) benutzt, mit der das Volumen der bei der Retraktion ausgepreßten Flüssigkeit bestimmt wird.

Prinzip: Plättchenreiches Testplasma wird zwecks Sicherstellung eines ausreichenden Fibrinogengehaltes mit plättchenfreiem Mischplasma versetzt und Thrombin zugegeben, um etwaige Störungen der 1. oder 2. Gerinnungsphase auszuschalten.

*Altrogge Spezialfutterwerk Lage/Lippe

In den Ansatz wird ferner CaCl_2 gegeben und physiologische Kochsalzlösung; diese zur Verdünnung des freiwerdenden Serums, weil durch das größere Flüssigkeitsvolumen die Messung genauer wird.

Ein zweiter Ansatz ohne Testplasma dient als Kontrolle.

Von mehreren Autoren wurde festgestellt, daß Fette an silikonierten Oberflächen hängenbleiben (MAUPIN, 1969), deshalb wurden die für den Retraktionsansatz verwendeten Wassermannröhrchen nicht silikoniert, weil eine Verfälschung des Ergebnisses durch nicht zur Verfügung stehende Phospholipide eintreten kann. In Vorversuchen war abgeklärt worden, daß die Flüssigkeitsausbeute bei unbehandelten und ausgeglühten Wassermannröhrchen gleich war.

Durchführung:

Gewinnung des Blutes

Die Blutentnahme erfolgte mit einer silikonierten 1,1 x 30 mm-Kanüle aus der V. cephalica antebra- chii oder der V. saphena. Die ersten Blutstropfen wurden wegen möglicher Vermischung mit Gewebssaft verworfen.

Durch Vorversuche war festgestellt worden, daß ein Mischungsverhältnis von Antikoagulans zu Blut von 1 : 1,5 für die Gewinnung von plättchenreichem und von 1 : 9 für die Gewinnung von plättchenarmem Plasma eine genügende Ausbeute und eine störungsfreie Retraktion gewährleistet.

Zum Auffangen des Blutes dienten silikonier- te, konisch zulaufende Reagenzgläser mit einer Eichmarke bei 5 ml, von denen 5 als Antikoagulans je 2 ml Acid-Citrat-Dextrose (ACD) enthielten und 2 je 0,5 ml 3,13 %ige NaCitrat-Lösung. Die zuerst genannten 5 Röhrchen dienten zur Gewinnung von plättchenreichem, die beiden anderen zur Gewinnung von plättchenarmem Plasma. Nachdem die Röhrchen mit Blut bis zur Marke gefüllt waren, wurden sie mit einem Silikonstopfen verschlossen; durch vorsichtiges Drehen um die Längsachse erfolgte die Mischung des Inhalts.

Gewinnung von Mischplasma

Das Blut für die Gewinnung von plättchenarmem Mischplasma wurde von sechs Versuchshunden, wie für das plättchenarme Plasma beschrieben, aufgefangen und weiterbehandelt. Es wurde danach in Portionen zu 7 ml in Plastikröhrchen eingefroren. Je ein Röhrchen wurde unmittelbar vor einem Versuch im Wasserbad bei 37°C aufgetaut.

Gewinnung von Testplasma

Die Gewinnung von plättchenreichem Plasma (platelet rich plasma, PRP) erfolgte, indem das Blut-ACD-Gemisch 10 min bei 100 g zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde mit einer silikonierten Pipette abgehebert und in einem Plastikröhrchen aufbewahrt.

Zur Gewinnung von plättchenarmem Plasma (platelet poor plasma, PPP) desselben Hundes wurde Blut-Citrat-Gemisch bei Raumtemperatur mit 2000 g 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in Plastikröhrchen gegeben und in einer Kühlzentrifuge bei 5°C und 2000 g nochmals 30 min zentrifugiert.

Das PPP wurde benutzt, um vom PRP Verdünnungen anzusetzen. Für den durchzuführenden Vergleich der Retraktion in Abhängigkeit von der Thrombocytenzahl wurden folgende Ansätze verwendet:

- 1) 2 ml PRP
- 2) 1 ml PRP + 1 ml PPP
- 3) 0,2 ml PRP + 1,8 ml PPP

Thrombocytenzählung

Die Thrombocytenzählung wurde nach BRECHER und CRONKITE (1950) durchgeführt. Dabei wird das zu untersuchende thrombocytenhaltige Plasma mit 1 %iger Ammoniumoxalatlösung, die dunkel aufbewahrt und vor jedem Gebrauch filtriert wird, verdünnt, indem in eine Erythrocytenzählpipette das gut durchgemischte Plasma bis zur Marke 1 und anschließend die Ammoniumoxalatlösung bis zur Marke 101 oberhalb der Mischampulle aufgezogen wird. Die Pipette wird zwecks Mischung des Inhalts zwischen

den Fingern gedreht und bleibt 30 min liegen, bis etwa noch vorhandene Erythrocyten hämolysiert sind. Danach wird abermals gemischt und nach Verwerfen der ersten 3 Tropfen eine Zählkammer nach THOMA (Kammertiefe 0,05 mm) mit dem Ampulleninhalt beschickt. Diese kommt für 15 min in eine feuchte Kammer, damit sich die Thrombocyten am Boden absetzen. Die Thrombocytenzahl ergibt sich als Mittelwert der Auszählung beider Zählnetze der Kammer unter Berücksichtigung von ausgezähltem Volumen und Verdünnung.

Ablauf des Versuches

In ein Wassermannröhrchen aus Glas (nicht silikoniert) wurden 3,3 ml physiologische Kochsalzlösung (0,9 %ig), 1 ml Mischplasma, 0,5 ml Testplasma der jeweiligen Verdünnungsstufe, 0,1 ml CaCl_2 (0,025 molar) und 0,1 ml Thrombinlösung in der angegebenen Reihenfolge pipettiert. Nach der Thrombinzugabe wurde der Ansatz durch einmaliges Umkippen des Röhrchens sofort durchmischt, um eine im ganzen Röhrchen gleichzeitig einsetzende Gerinnung zu erreichen. Sie beginnt innerhalb von 20 sec.

Anschließend wurden die Wassermannröhrchen in ein Wasserbad von 37°C gestellt. Zwei min später wurden die Röhrchen am oberen Rand mit Daumen und Zeigefinger gefaßt und mit einer schnellenden Bewegung um die Längsachse gedreht. Dadurch löst sich das Gerinnsel von der Wand.

Nach 60 min wird das Gerinnsel vorsichtig mit einer Pinzette entfernt. Die zurückgebliebene Flüssigkeit wird in einem Meßzylinder gemessen.

Für jedes Mischungsverhältnis wurde ein Doppelversuch angesetzt sowie eine Leerprobe aus 1 ml Mischplasma, 3,9 ml NaCl-Lösung und 0,1 ml Thrombinlösung (6 NIH-Einheiten⁺).

⁺) Behringwerke AG Marburg/Lahn

PRP			PRP : PPP = 1 : 1		PRP : PPP = 1 : 10	
Hd.	Thr	Fl	Thr	Fl	Thr	Fl
Nr.	x 10 ³	ml	x 10 ³	ml	x 10 ³	ml
1	296	2,45	166	1,50	47	0,65
2	297	3,50	202	1,25	51	1,85
	741	4,80	151	3,92	71	1,25
	471	4,50	216	3,95	54	1,05
3	293	4,20	189	3,20	17	1,00
4	436	4,75	200	4,20	55	2,30
5	391	4,50	232	1,90	43	0,75
	1077	4,50	376	3,80	65	0,80
	426	4,60	245	4,40	35	1,00
6	341	4,75	215	4,00	34	1,90
7	492	4,55	255	2,80	54	1,85
8	441	4,80	247	4,10	77	1,90
	608	4,35	213	3,30	88	1,05
	488	4,50	236	3,85	46	0,75
9	866	4,80	421	4,35	82	1,65
	588	4,65	394	4,30	145	1,50
	624	4,25	239	3,70	39	0,65
10	483	4,75	209	4,20	40	2,10
	564	4,55	443	3,65	45	1,20
	1120	4,60	503	4,00	94	0,95
11	412	4,90	225	4,50	36	1,90
	777	4,45	372	3,45	56	1,15
	298	4,45	183	3,65	39	1,00
12	366	4,55	166	3,55	40	1,45
13	197	4,45	83	3,50	40	1,65
	393	4,05	249	3,05	44	0,75
	250	3,95	94	2,95	45	0,70
14	973	4,75	389	2,60	163	1,85
15	306	4,40	180	3,60	32	1,35
	394	4,00	301	3,10	55	0,70
	330	3,25	283	3,05	31	0,90

Tabelle 1: Thrombocytenzahl (Thr) und Flüssigkeitsausbeute nach der Retraktion des Gerinnsels (Fl) in 31 Versuchen an 15 Hunden. PRP und PPP, plättchenreiches sowie plättchenarmes Plasma.

PRP

PRP : PFP
= 1 : 1

PRP : PFP
= 1 : 10

Hd. Nr.	Thr x 10 ³	Fl ml	Thr x 10 ³	Fl ml	Thr x 10 ³	Fl ml
1	302 290	2,00 2,90	182 150	1,60 1,40	58 36	0,40 0,90
2	328 266	3,40 3,60	220 184	1,10 1,40	58 44	1,20 2,50
	920 562	4,80 4,80	134 168	3,90 3,95	72 70	1,00 1,50
	480 490	4,50 4,50	214 218	4,00 3,90	28 80	0,80 1,30
3	310 276	4,10 4,30	180 184	3,20 3,20	20 14	1,10 0,90
4	322 550	4,65 4,80	226 174	4,15 4,20	52 58	2,00 2,60
5	390 392	4,40 4,60	228 236	2,10 1,70	64 22	0,50 1,00
	1052 1102	4,50 4,50	412 340	3,80 3,80	56 74	0,80 0,80
	476 376	4,50 4,70	266 224	4,40 4,40	42 28	0,50 1,50
6	342 352	4,80 4,70	230 200	4,00 4,00	40 28	2,20 1,60
7	516 468	4,60 4,50	276 234	2,50 3,10	52 56	1,80 1,90
8	492 390	4,80 4,75	298 196	4,10 4,10	98 56	1,60 2,20
	634 582	4,20 4,50	220 206	3,30 3,30	90 86	1,50 0,60
	468 508	4,50 4,50	220 252	3,80 3,90	34 58	0,50 1,00
9	936 796	4,80 4,80	434 408	4,30 4,40	90 74	1,80 1,50
	556 620	4,70 4,60	436 354	4,40 4,20	156 134	1,50 1,50
	652 596	4,20 4,30	256 222	3,60 3,80	46 32	0,70 0,60

	PRP		PRP : PPP = 1 : 1		PRP : PPP	
Hd. Nr.	Thr x 10 ³	Fl ml	Thr x 10 ³	Fl ml	Thr x 10 ³	Fl ml
10	508	4,70	186	4,20	32	2,00
	458	4,80	232	4,20	48	2,20
	604	4,60	472	3,70	48	1,30
	524	4,50	414	3,60	42	1,10
	1100	4,60	570	3,80	112	0,70
	1152	4,60	436	4,20	76	1,20
11	372	4,40	248	4,45	38	2,00
	452	4,85	202	4,45	34	1,80
	774	4,40	432	3,40	58	1,10
	780	4,50	312	3,50	54	1,00
	276	4,40	194	3,60	34	0,50
	334	4,50	172	3,70	44	1,50
12	364	4,50	162	3,50	38	1,50
	368	4,60	170	3,60	42	1,40
13	192	4,40	82	3,50	52	1,20
	202	4,50	84	3,50	28	2,10
	322	4,10	224	3,20	50	0,80
	470	4,00	274	2,90	38	0,70
	166	4,00	88	3,00	22	0,50
	346	3,90	99	2,90	23	0,90
14	986	4,80	416	2,00	136	1,70
	960	4,70	362	3,20	190	2,00
15	320	4,30	184	3,60	40	1,40
	292	4,50	176	3,60	24	1,40
	356	4,40	350	3,00	56	0,60
	432	4,20	252	3,20	54	0,80
	342	3,20	276	3,00	24	0,80
	318	3,30	290	3,10	38	1,00

Tabelle 2: Einzelbestimmungen (Abkürzungen s. Tabelle 1)

B. Ergebnisse

Die Ergebnisse von 93 Ansätzen mit unterschiedlicher Thrombocytenzahl aus 31 Versuchen, bei denen 7 Hunde mehrfach untersucht wurden, gibt Tabelle 1 wieder. Sie enthält die Mittelwerte aus den Doppelbestimmungen.

Die Ergebnisse der einzelnen Bestimmungen sind in Tabelle 2 niedergelegt.

Die Genauigkeit der Methode wurde über die Differenz (d_i) der Ergebnisse aus beiden Ansätzen ($x_{i2} - x_{i1}$; x_i = Ergebnis des Ansatzes) als mittlere Differenz ($\bar{d}$) berechnet und nach der Formel

$$t = \frac{\bar{d} \sqrt{n}}{s} \quad \begin{array}{l} n = \text{Anzahl der Differenzen;} \\ s = \text{Standardabweichung der Differenzen;} \end{array}$$

auf Signifikanz geprüft (WEBER, 1967).

Dabei ergab sich für die R e t r a k t i o n :

PRP	:	PPP		
1	:	0	$\bar{d} = - 0,07 \pm 0,67$	$p > 0,05$
1	:	1	$\bar{d} = - 0,07 \pm 0,70$	$p > 0,05$
1	:	10	$\bar{d} = - 0,22 \pm 2,07$	$p > 0,05$

Insgesamt lagen die Werte für die Flüssigkeitsausbeute bei Doppelbestimmung nahe beieinander. Es zeigt sich, daß die Differenzen als zufällig angesehen werden können. Sie sind bei Verwendung von plättchenreichem Plasma und bei dessen Verdünnung mit Plasma im Verhältnis 1 : 1 geringer als in der größeren Verdünnung. Der Unterschied in den Standardabweichungen der Verdünnungen 1 : 10 und 1 : 1 ist signifikant ($p < 0,01$; F-Test).

Für die Thrombocytenzählung war das Ergebnis dieser Prüfung: (Plättchenzahl in 1000/ μ l)

PRP	:	PPP		
1	:	0	$\bar{d} = + 20,4 \pm 101$	$p > 0,05$
1	:	1	$\bar{d} = + 28,7 \pm 47$	$p < 0,01$
1	:	10	$\bar{d} = + 4,5 \pm 23$	$p > 0,05$

Die Übereinstimmung der Doppelbestimmungen ist offensichtlich bei der stärksten Verdünnung besser als in den thrombocytenreichen Proben.

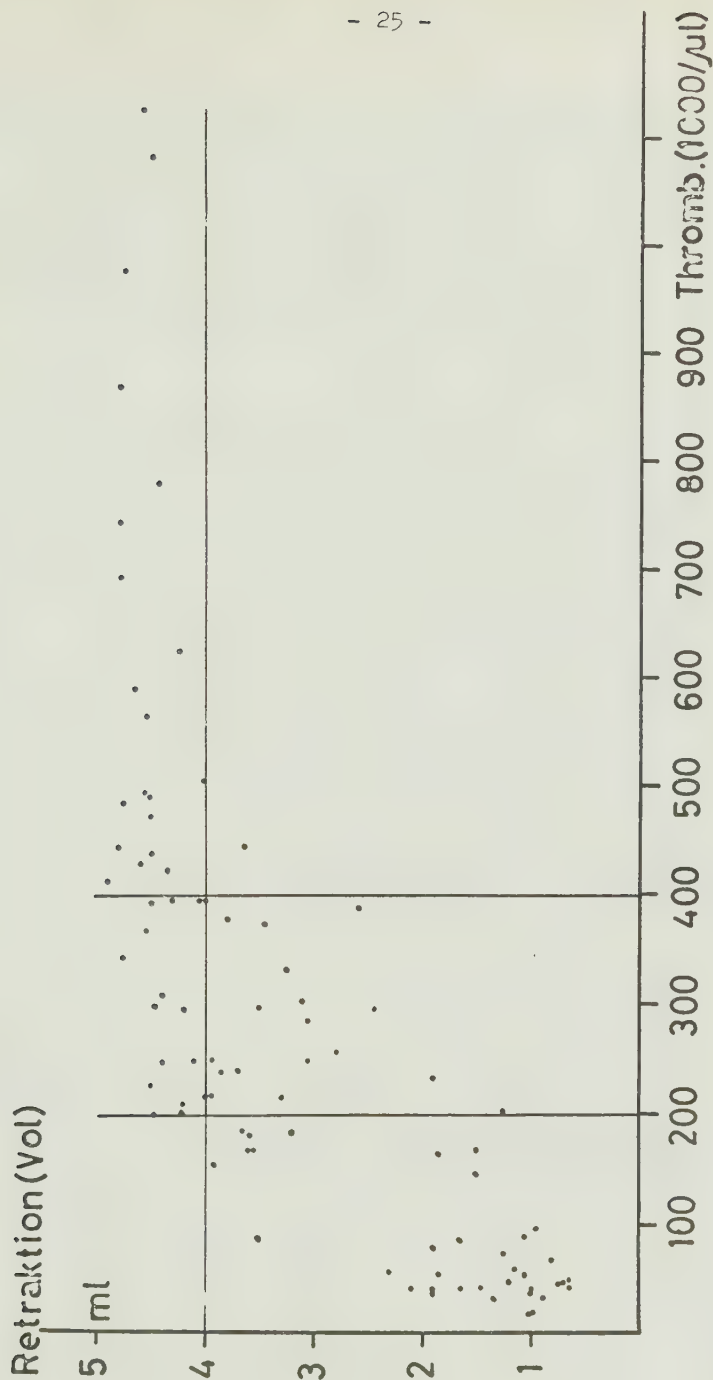


Abbildung 1: Korrelation zwischen Thrombocytenzahl und Retraktion,
gemessen in ml der vom Gerinnsel ausgepreßten Flüssigkeit.

Im unverdünnten thrombocytenreichen Plasma ist die Standardabweichung der Differenzen mehr als viermal größer als in der Verdünnung 1 : 10. Die positiven Vorzeichen der mittleren Differenzen zeigen an, daß im zuerst ausgezählten Zählnetz der Kammer überwiegend mehr Plättchen gezählt wurden als in der danach ausgezählten. Nur für die Verdünnung 1 : 1 ist dieses Ergebnis jedoch signifikant. Die Unterschiede in den Standardabweichungen sind sämtlich signifikant ($p < 0,01$; F-Test).

In Abbildung 1 sind die Retraktionsergebnisse in ihrer Beziehung zu der im jeweiligen Versuch verwendeten Thrombocytenzahl graphisch dargestellt. Es ergibt sich ein Punkteschwarm, der eine gewisse Ausrichtung erkennen läßt. Im Bereich unter 100 000 Thrombocyten/ μ l Plasma wurden überwiegend Retraktionswerte unter 2 ml gefunden. Bei Versuchen, die mit Plättchenwerten zwischen 100 000 und 400 000/ μ l durchgeführt wurden, zeigen die Retraktionswerte eine Streuung, die sich von etwa 1,5 ml bis zu fast 5 ml erstreckt. Es ist jedoch unverkennbar, daß die niedrigen Retraktionswerte mit zunehmender Thrombocytenkonzentration seltener werden. Oberhalb von einer Plättchenkonzentration von 400 000/ μ l wurden fast ausschließlich mehr als 4 ml Flüssigkeit gewonnen. Insgesamt gesehen ergibt sich somit eine Krümmungstendenz in der Richtung des Punkteschwarmes.

Nach BUDTZ-OLSEN (1951) ergibt sich zwischen den Retraktionswerten und den Logarithmen der zugeordneten Thrombocytenzahlen eine lineare Beziehung. Abbildung 2 zeigt, daß dies auch für den Hund gilt. Der Vorteil einer solchen Transformation ist eine einfach zu handhabende rechnerische Beziehung, die mit definierter Genauigkeit Voraussagen über das Retraktionsergebnis bei gegebener Thrombocytenzahl zu machen gestattet.

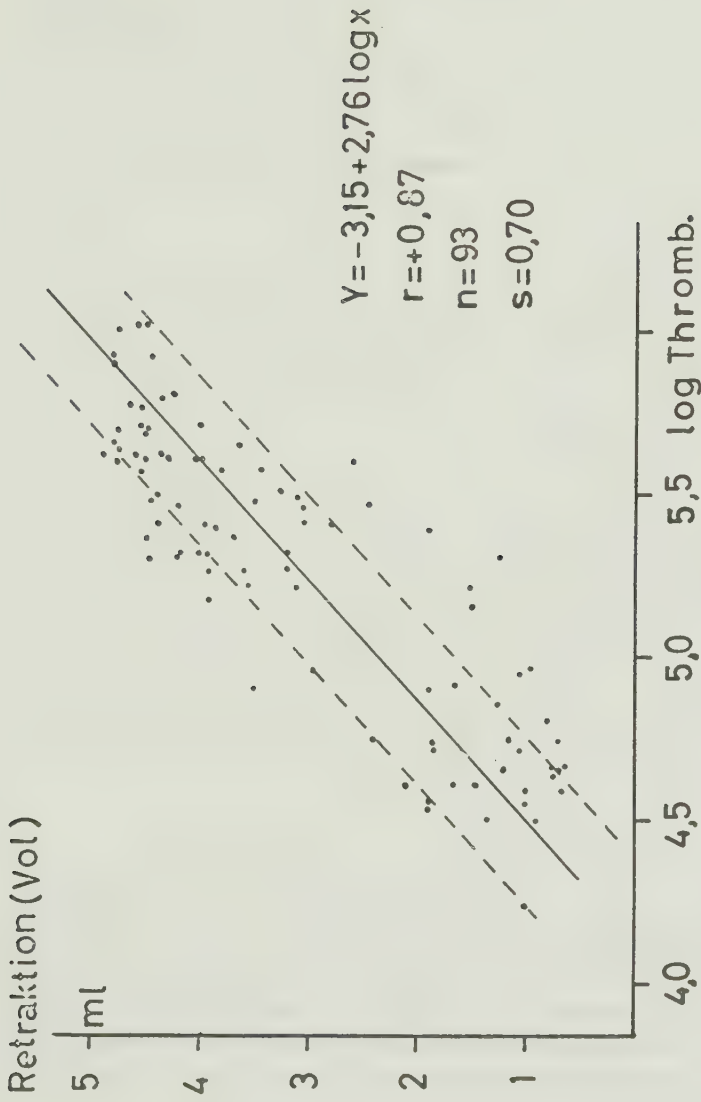


Abbildung 2: Korrelation vi. Abbildung 1, halblogarithmisch

IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die Retraktion des Gerinnsels läuft im Retraktionsversuch nach BREDDIN als ein physikalisch-chemischer Vorgang ab, an dem in erster Linie das Fibrin und die Thrombocyten beteiligt sind. Durch die Versuchsanordnung ist insbesondere für einen ausreichenden Fibrinogengehalt gesorgt. So hängt das Ergebnis vor allem von den Thrombocyten ab. Ihre Zahl und ihre Qualität sind bestimmend für das Resultat, das an der vom Gerinnsel ausgepreßten Flüssigkeitsmenge gemessen wird.

Eine Abhängigkeit der Retraktion von der Thrombocytenzahl ist von Nachteil, wenn der Retraktionsversuch zur Prüfung der Funktionsfähigkeit der Blutplättchen dienen soll. Es ist notwendig, die Art der Abhängigkeit zu kennen, um sie bei der Beurteilung des Retraktionsergebnisses berücksichtigen zu können.

Das in den hier durchgeführten Untersuchungen verwendete Testplasma wurde für jeden Versuch auf 3 verschiedene Plättchenkonzentrationen eingestellt. In den Tabellen ist die Thrombocytenzahl in 1 000/ μ l Testplasma angegeben. Auf 1 ml berechnet ist die Thrombocytenzahl um das 10^3 fache größer; 0,5 ml Testplasma wurden in einen Ansatz eingebracht, der ein Gesamtvolumen von 5 ml hatte. Für den Gerinnungsansatz ergibt sich daher eine Thrombocytenzahl pro μ l, die sich aus einer in der Tabelle angegebenen Zahl (z. B. 296) wie folgt errechnet:

$$\frac{296 \times 10^3 \times 10^3}{5 \times 5 \times 10^6} = 11,84 \times 10^3/\mu\text{l}$$

Für die extremen Thrombocytenwerte, die in den Testplasmen gefunden wurden (14 000 bzw. 1 152 000/ μ l; s. Tabelle 2), ergeben sich demnach im Ansatz 560 bzw. 46080 Thrombocyten pro μ l. Im Vergleich zu der beim normalen Hund im Blut gefundenen Plättchenkonzentration (150 000 - 500 000/ μ l) sind im Retraktionsversuch also nur geringe Mengen von Thrombocyten beteiligt.

Die Feststellung der Thrombocytenzahl ist, wie die Berechnung der Differenzen der Doppelbestimmungen zeigt, um so ungenauer, je höher die Thrombocytenkonzentration in der untersuchten Lösung ist.

Der Verdünnungseffekt auf die Plättchenzahl beim Ansatz der Testseren wurde ebenfalls geprüft. In der Mischung $PRP : PPP = 1 : 1$ hätten jeweils halb so viel, in der Mischung $1 : 10$ ein Zehntel der im unverdünnten PRP festgestellten Thrombocytenzahl sein sollen. Statt der Proportionen 2 bzw. 10 ergaben sich tatsächlich Werte von 1,2 bis 3,0 bzw. 5 bis 17; am häufigsten wurden Verhältniszahlen zwischen 1,8 und 2,4 bzw. 8 und 14 gefunden.

HOWALD (1950) vermutet, daß eine exakte Verdünnungsreihe vor allem deshalb nicht zustande kommt, weil die Thrombocyten sich zu Aggregaten zusammenlagern können. Es ist auch damit zu rechnen, daß Plättchenaggregate beim Ablauf des Gerinnungsvorganges weniger wirksam sind als eine entsprechende Anzahl freier Plättchen.

Trotz der erheblichen, aber nicht zu vermeidenden Ungenauigkeiten in der Bestimmung der Thrombocytenzahl ergab sich bei 93 Ansätzen eine deutliche Abhängigkeit zwischen Thrombocytenzahl und Retraktionsergebnis.

In den ohne Testplasma angesetzten Leerproben findet eine Retraktion des gallertigen Inhalts nicht statt. Niedrige Thrombocytenwerte reichen nach Abbildung 1 nicht aus, um eine vollständige Retraktion des Gerinnsels zu bewerkstelligen. Im 5 ml-Ansatz wurden bei Abszissenwerten unter 100 (entsprechend 4 000 Thrombocyten/ μ l Ansatz) mit einer Ausnahme nur Retraktionswerte unter 2,5 ml gefunden.

Demgegenüber wurden mit Testplasmen von 400 000 Thrombocyten/ μ l und mehr (16 000/ μ l Ansatz) fast ausnahmslos Flüssigkeitsmengen über 4 ml erzielt.

Im Bereich der Abszissenwerte 100 bis 200 ergaben 4 Ansätze Ausbeuten unter 2 ml und 7 Ansätze mehr als 3 ml.

Aus der Punkteverteilung im Abszissenbereich 200 bis 400 ist zu entnehmen, daß Thrombocyten, wenn sie im Ansatz 8 000/ μ l ausmachen, eine 80 %ige Retraktion (4 ml) erzeugen können, aber offensichtlich nicht in jedem Fall.

Neben der Zahl kommt es auf die Funktionsfähigkeit der Plättchen an.

Zu den Werten, die im Abszissenbereich 200 bis 400 aufgetragen sind, steuerten Ansätze mit unverdünntem Testplasma 12 und Ansätze mit Testplasma in der Verdünnung 1 : 1 20 Werte bei. Um zu prüfen, ob etwa die Verdünnungsmanipulation einen Einfluß ausgeübt haben könnte, wurden die Punkte dieses Bereiches nach dem verwendeten Testplasma getrennt aufgetragen. Es ließ sich kein Einfluß der Verdünnung des Testplasmas auf die Verteilung der Korrelationspunkte nachweisen.

Wird einmal angenommen, daß voll funktionsfähige Plättchen in einer Konzentration von 8000/ μ l ausreichen, um in 5 ml Ansatz eine Retraktion von 80 % (4 ml) zu erzielen, so stellt sich für die einzelnen Hunde das Ergebnis folgendermaßen dar:

Von den 7 je einmal untersuchten Tieren haben 4 (3, 4, 6, 12) die Bedingungen erfüllt und 3 (1, 7, 14) nicht. Bei den im Abstand von mehreren Monaten dreimal untersuchten Hunden wurde die Bedingung von 4 Hunden (5, 9, 11, 10) einmal und von 4 Hunden (2, 8, 13, 15) zweimal nicht erreicht.

Aus Tabelle 1 ist zu sehen, daß bei Verwendung von unverdünntem Testplasma überwiegend Retraktionswerte oberhalb von 4 ml erzielt wurden. Dabei war die Thrombocytenzahl von 200 000/ μ l Testplasma nur einmal knapp unterschritten (Hund 13). In 4 Fällen jedoch wurde mit Retraktionswerten von 2,45; 3,50; 3,95 und 3,25 (Hunde 1, 2, 13, 15,) die 4 ml Marke nicht erreicht. Unter diesen Fällen waren 2 (Hunde 2 und 15), in denen auch die PRP-Verdünnung 1 : 1 noch mehr als 200 000 Thrombocyten/ μ l Testplasma aufwies. In beiden blieben auch diese Ansätze unterhalb von 4 ml Retraktionsflüssigkeit (1,25 bzw. 3,05 ml).

Eine Beurteilung der vorliegenden Befunde im Hinblick auf die Möglichkeit, das angewandte Verfahren als eine Funktionsprüfung der Thrombocyten beim Hund zu benutzen, hat verschiedene Argumente zu berücksichtigen.

Ein Retraktionsergebnis von mindestens 4 ml Flüssigkeitsausbeute in einem Ansatz von 5 ml ist möglich und bietet sich wegen der Häufigkeit des Vorkommens bei klinisch gesund erscheinenden Hunden als Grenzwert für die Beurteilung des Testergebnisses an.

Die Abhängigkeit des Testergebnisses von der Thrombocytenzahl macht es notwendig, die Thrombocyten im Testplasma zu zählen. Wegen der Ungenauigkeit, die der Thrombocytenzählung namentlich in thrombocytenreichen Plasmen anhaftet, kann auf eine Doppelbestimmung der Thrombocytenzahl nicht verzichtet werden.

Auch bei Verwendung von funktionstüchtigen Plättchen reichen Thrombocytenzahlen unter 200 000/ μ l Testplasma (8 000/ μ l Ansatz) nicht aus, um eine 80 %ige Retraktion zu garantieren. Es ist damit zu rechnen, daß bei Verwendung von Testplasmen, die neben Plättchen mit herabgesetzter Funktion auch funktionstüchtige Plättchen enthalten, ein Überschuß dieser eine vollständige Retraktion bewirken kann. Deshalb dürfte es sich zur Aufdeckung von Funktionsmängeln der Plättchen empfehlen, die im Versuch verwendete Plättchenzahl nach oben zu begrenzen.

Aus den vorliegenden Versuchsergebnissen ist eine zweckmäßige Abgrenzung der im Retraktionstest zu verwendenden Thrombocytenzahl nach oben und unten nur unter dem Vorbehalt späterer Korrektur möglich. Die Zahl der untersuchten Hunde ist zu gering, um in dieser Hinsicht allgemeingültige Folgerungen abzuleiten. Für die Prüfung einer klinischen Nutzenanwendung müßten überdies Patienten mit Gerinnungsstörungen in die Untersuchung einbezogen werden.

Es ist denkbar, daß bei einem hohen Anteil funktionsunfähiger Plättchen das Retraktionsergebnis auch bei Verwendung großer Thrombocytenmengen zu niedrig ausfällt; ebenso allerdings, daß bei klinisch gesund erscheinenden Hunden Funktionsmängel der Plättchen vorkommen.

Festgestellt wurde, daß solche Tiere bei mehr als 8 000 Plättchen pro μ l Ansatz eine 80 %ige Retraktion zeigen können. In einem erheblichen Teil der Versuche lagen die Ergebnisse bei Thrombocytenzahlen von 8 000 - 18 000/ μ l Ansatz jedoch niedriger.

Wenn sich, wie zu vermuten, darin Funktionsmängel der Plättchen ausdrücken, so bleibt dahingestellt, ob sie natur- oder versuchsbedingt entstanden sind.

Immerhin sprechen die Befunde, daß von 8 dreimal untersuchten Hunden 4 Tiere zweimal zu verschiedener Zeit ein zu niedriges Retraktionsergebnis aufwiesen und daß bei 2 Hunden je zwei Ansätze mit unterschiedlicher Thrombocytenkonzentration das gleiche, zu niedrige Ergebnis brachten für die Möglichkeit des Vorliegens echter Funktionsmängel der Thrombocyten bei diesen klinisch gesund erscheinenden Tieren.

Nach dem derzeitigen Kenntnisstand empfiehlt es sich beim Hund, den Retraktionsversuch mit Thrombocytenkonzentrationen von 200 000 bis 400 000 Thrombocyten/ μ l Testplasma (8 000 bis 16 000/ μ l Ansatz) durchzuführen.

Beim Retraktionsversuch am Menschen wird das Testplasma auf eine bestimmte Thrombocytenzahl eingestellt. BETTEX-GALLAND und LÜSCHER (1960) verdünnen das PRP mit PPP auf eine Konzentration von 300 000 Thrombocyten pro μ l. Für das von ihnen verwendete Ansatzvolumen ergeben sich damit 150 000/ μ l. Nach BREDDIN (1968) ist beim Menschen eine Thrombocytenzahl von 20 000/ μ l Ansatz ausreichend, um bei funktionstüchtigen Plättchen eine normale Retraktion zu erzielen. Das entspricht etwa dem Verhältnis, wie es hier für den Hund gefunden wurde.

Klinische Anwendung findet der Retraktionstest zur Aufdeckung von Thrombocytendefekten.

In der Humanmedizin sind verschiedene Arzneimittel bekannt (Aspirin, Phenylbutazon u. a.), die die Plättchenfunktion herabsetzen können. In derartigen Fällen wird der Retraktionsversuch eingesetzt. Ferner zur Überwachung der Therapie mit Antikoagulantien. HALL wies 1972 darauf hin, daß bei Urämie des Hundes eine Störung der Plättchenfunktion vorkommen kann. Selten wird beim Menschen eine erbliche Thrombasthenie, die als GLANZMANNsche Krankheit bekannt wurde, beobachtet.

Beim Hund beschrieb DODDS 1967 ein Krankheitsbild, das der GLANZMANNschen Krankheit des Menschen ähnlich war. Es trat in einer Otterhundfamilie auf. Die Thrombocytenzahl war normal oder mäßig erniedrigt. Im Aggregationsversuch konnte durch ADP, Thrombin oder Kollagen keine Zusammenlagerung der Plättchen erreicht werden. Der Retraktionsversuch mit PRP, das auf 300 000 Thrombocyten pro μ l eingestellt war, verlief negativ. Die Aktivität der Plasma-Gerinnungsfaktoren war ausreichend.

Abgesehen vom klinischen Bereich, wo, wie die Befunde von DODDS und HALL zeigen, mit dem Vorkommen von Krankheiten zu rechnen ist, die die Thrombocytenfunktion in Mitleidenschaft ziehen, wird man den Retraktionstest im Tierversuch am Hund, namentlich bei der Prüfung von Stoffen, die einen Einfluß auf die Thrombocyten haben, mit Nutzen verwenden können. Als Routinemethode ist das Verfahren wohl zu arbeitsintensiv, nicht zuletzt wegen der erforderlichen Thrombocytenzählungen. Der Einsatz für spezielle Fragestellungen ist jedoch gerechtfertigt, weil der Retraktionsversuch bei geringer Fehlerbreite eine unter Umständen bedeutungsvolle Aussage zu machen gestattet.

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

Nach der Darstellung von Literaturangaben zur Entwicklung der Kenntnisse über die Thrombocyten in ihrer Bedeutung für die Gerinnselretraktion wurden eigene Untersuchungen über die Messung der in vitro vom Gerinnsel ausgepreßten Flüssigkeitsmenge beschrieben, bei denen Testplasmen vom Hund mit unterschiedlicher Thrombocytenkonzentration Verwendung fanden (Methode nach BREDDIN, 1968).

Bei Verwendung des Blutes von 15 klinisch gesund erscheinenden, erwachsenen Hunden ergab sich, daß in 5 ml Ansatz mindestens 8 000 Thrombocyten/ μ l vorhanden sein müssen, um eine 80 %ige Retraktion (4 ml Flüssigkeit) zu erzielen. Betrug die Thrombocytenkonzentration 20 000/ μ l oder mehr, so wurden fast ausnahmslos 80 %ige Retraktionen erreicht. In dem Bereich dazwischen (8 000 - 20 000 Thrombocyten/ μ l Ansatz, entsprechend etwa 200 000 bis 400 000/ μ l Testplasma) wurden Retraktionen zwischen 25 und 98 % gefunden. Zur Prüfung der Thrombocytenfunktion beim Hund ist demnach die Verwendung eines Testplasmas von durchschnittlich 300 000 Thrombocyten/ μ l empfehlenswert.

S u m m a r y

From literature descriptions on the development of knowledge on platelets and their importance for clot retraction own investigations were described on measuring the amount of liquid pressed out of clot in vitro in which dog test plasma of different platelet concentration was used (method after BREDDIN, 1968).

The use of blood of 15 grown up dogs appearing clinically healthy showed that at least 8,000 platelets/ μ l must be present in 5 ml of the preparation in order to achieve a retraction of 80 % (4 ml of liquid). A platelet concentration of 20,000 or more/ μ l resulted almost without exception in a retraction of 80 %. In the range between 8,000 to 20,000 platelets per μ l of preparation (corresponding to about 200,000 to 400,000 / μ l of test plasma) retractions between 25 % and 98 % were found. Therefore the use of an average test plasma of 300,000 platelets / μ l is to be recommended for investigating the platelet function in dogs.

VI. Literaturverzeichnis

- Aggeler, P.M.; Hamlin, S.M.
und Lucia, S.P. (1942)
- Blood clot retraction I
Measurement of the
extracorpuscular volume of
the clot.
J.Lab.clin. Med. 28, 89-97.
cit. n. Budtz-Olsen, D.F.
- Babington, B.G. (1830)
- Considerations with respect
to the blood.
Med. and Chir. Tr. 16, 292
cit. n. Budtz-Olsen, D.F.
- Bang, N.U.; Beller, F.K.;
Deutsch, E. und Mammen, E.F.
(1971)
- Thrombosis and bleeding
disorders.
Stuttgart - New York
Thieme Verlag, Academic Press
- Bayerle, H.; Hell, H.
und Marx, R. (1949)
- Über eine neue Methode zur
Messung der Retraktion ge-
ronnenen Blutes.
Klin.Wschr. 27, 237 - 238
- Bennewitz, A. (1955)
- Über den Einfluß der H-Ionen-
konzentration auf die Re-
traktion.
Med. Diss., Bonn
- Benthaus, J. (1959)
- Über die Retraktion des
Blutgerinnsels.
Thrombos.Diathes.haemorrh. 3,
311 - 352
- Bettex-Galland, M. (1971)
- Clot retraction
in: Thrombosis and bleeding
disorders hrsg.v.
Bang, N.U.; Beller, F.K.;
Deutsch, E. und Mammen, E.F.

- Bizzozzero, J. (1882) Über einen neuen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung.
Virchows Arch. path. Anat. 90, 261 - 332
cit. n. v. Schaewen, Helga
- Boroviczény, K.G.; Schipperges, H. und Seidler, E. (1974) Einführung in die Geschichte der Hämatologie.
Stuttgart, Thieme Verlag
- Brecher, G. und Cronkite, E.P. (1950) Morphology and enumeration of human blood platelets.
J.appl.Physiol. 3, 365 - 377
- Breddin, K. (1968) Die Thrombocytenfunktion bei hämorrhagischen Diathesen, Thrombosen und Gefäßkrankheiten.
Stuttgart - New York
F.K. Schattauer Verlag
- Budtz-Olsen, D.F. (1951) Clot retraction.
Oxford, Blackwell
- Davie, E.W.; Ratnoff, O.D. (1964) Waterfall sequence for intrinsic blood clotting.
Science, 145, 1310 - 1311
- Deckhuyzen, M.C. (1901) Über die Thrombocyten (Blutplättchen)
Anat. Anz. 19, 529 - 540
cit. n. v. Schaewen, Helga

Dodds, W.J. (1967)

Familial canine thrombocytopathy
in: Platelets: Their Role in
Hemostasis and Thrombosis
Brinkhous et. al.
Stuttgart, F.K. Schattauer Verlag

Donné, A.C. (1842)

De l'origine des globules du
sang, de leur modes de formation,
de leur fin.
Compt. rend.Acad.Sci. 14, 366
cit. n. Budtz-Olsen, D.F.

Ebert, J.C. und
Schimmelbusch, C. (1885)

Die Blutplättchen und die Blut-
gerinnung.
Virchows Arch. path. Anat, 101,
201 - 244
cit. n. v. Schaewen, Helga

Ellicott, E.Ch. und
Conby, C.L. (1951)

Retraction of clots formed from
purified fibrinogen.
Bull.Johns Hopk. Hosp. 88
321 - 331

Fonio, A. (1953)

Über die dritte Phase der Blutge-
rinnung und über die Funktion
der Strukturelemente der Thrombo-
cyten. Ergebn.inn. Med. Kinder-
heilk. 4, 1 - 51

Fonio, A. (1954) (a)

Über die Messung der Retraktions-
valenz des Fibringerinnsels.
Schweiz. med. Wschr. 84, 372 - 375

Fonio, A. (1954) (b)

Über den Aufbau und die Retraktion
des Fibringerinnsels in physio-
logischer und pathologischer Be-
ziehung.
Schweiz. med. Wschr. 84, 785 - 789

- Frost, H. (1971) Untersuchungen der arteriellen Gefäßinnenfläche mit dem Raster-elektronenmikroskop.
in: Generalisierte intravaskuläre Gerinnung. Beeinflussung der Hämostase durch gefäßaktive Pharmaka.
Verhandlungen d. Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Blutgerinnungsforschung. hrsg. v. Roka, L.
Gießen, b. F.K. Schattauer.
- Hall, D.E. (1972) Blood coagulation and its disorders in the dog.
London 1972
Baillière Tindall
- Hardisty, R.M. und Hutton, R.A. (1966) Platelet aggregation and the availability of platelet faktor 3.
Brit. J. Haemat. 12, 764 - 776
- Hardisty, R.M. (1974) und Weatherall, D.J. The haemostatic mechanism
in: Blood and its disorders.
Oxford, London, Edinburgh,
Blackwell Scientific publications.
- Harker, L.A. und Finch, L.A. (1969) Thrombokinetics in man.
J. of Clin. Invest. 48, 963 - 974
- Hartert, H. (1948) Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren.
Klin.Wschr. 26, 577 - 583
- Hewson, W. (1772) Experimental inquiry into the properties of the blood.
London (T. Cadell in the Strand)
cit. n. Budtz-Olsen D.F.

Hjort, P.F.; Rapaport, S.T.
und Owren, P.A. (1955)

Evidence that platelet accelerator
(platelet factor 1) is adsorbed
plasma proaccelerin.
Blood 10, 1139 - 1150

Hovig, T.; Rowsell, H.C.;
Dodds, W.J.; Jørgensen, L.
und Mustard, J.F. (1967)

Experimental hemostasis in
normal dogs and dogs with
congenital disorders of blood
coagulation.
Blood Vol. 30, No 5, 636 - 668

Howald, Ursula (1950)

Über den Einfluß abnehmender
Thrombocytenzahlen auf den Grad
der Retraktion des Blutplasma-
gerinnsels.
Med. Diss. Bern

Howell, W.H. (1891)

Observations upon the occurrence
structure and function of the
giant cells of the marrow.
J. Morph. 4, 117
cit. n. Boroviczény, K.G.;
Schipperges, H. und Seidler, E.

Howell und Donahue
(1938)

in: Maupin (1969)
Blood platelets in man and
animals, in two volumes.
Oxford, Pergamon Press 1969

Ivanitzky - Vasilenko, E.S.
und Klimova, M.S. (1937)

Studies on the physiology of
blood platelets.
I. Fluctuation in number of
thrombocytes in 24 hours in
relation to the state of
activity of autonomous nervous
system. Arch.int. Pharmacodyn.
55, 365 - 375.

- Ivenitzky - Vasilenko, E.S.
und Klimova, M.S. (1937) On psychic and reflectory influences on the number of platelets.
Arch.int. Pharmacodyn.
56, 19 - 32
- Jain, N.C. (1975) A scanning electron microscopic study of platelets of certain animal species.
Thrombos.Diathes.haemorrh.
(Stuttgart) 33, 501 - 507
- Jaques, L.B.; Fidler, E.;
Feldstedt, E.T. und
Mac Donald A.G. (1946) Silicones and blood coagulation.
Canad.med.Ass.J. 55, 26 - 31
cit. n. Budtz-Olsen, D.F.
- Jürgens, J. (1959) Retraktion
Thrombos.Diathes.haemorrh.
3, 682 - 686
- Kaufmann, R.M.; Airo, R.;
Pollack, S.; Crosby, W.H.
und Doberneck, R. (1965) Origin of pulmonary megakaryocytes.
Blood, 25, 767 - 775
- Kaufmann, R.M.; Airo, R.;
Pollack, S.; Crosby, W.H.
und Doberneck, R. (1965) Circulating megakaryocytes and platelet release in the lung.
Blood, 26, 720 - 731
- Kristenson, A. (1932) Untersuchungen über die Elastizität des Fibrinkoagulums.
Acta med. scand. 77, 351
cit. n. Budtz-Olsen, D.F.
- Le Sourd, L. und
Pagniez, Ph. (1907) La rétraction du caillot sanguin et les hémotoblastes.
J. Physiol.Path.gen. 2, 579
cit. n. Budtz-Olsen, D.F.

Macfarlane, D.E. und
Mills, D.C.B. (1975)

The effect of ATP on platelets:
Evidence against the central
role of released ADP in primary
aggregation.

Blood, 46, 309 - 319

Macfarlane, R.G. (1938)

The normal hemostatic mechanism
and its failure in the
haemorrhagic states.

Med. Diss. London

cit.n. Budtz-Olsen, D.F.

Macfarlane, R.G. (1939)

A simple method for measuring
clot retraction.

Lancet I, 199

cit.n. Benthous, J. 1959

Macfarlane, R.G. (1964)

An enzyme cascade in the blood
clotting mechanism and its
function as a biochemical
amplifier.

Nature, 202, 498 - 499

Morawitz, P. (1905)

Die Chemie der Blutgerinnung.

Ergebn. Physiol. 4, 307 - 422

Niepage, H. (1976)

Vortrag a.d. Symposion der DVG,
Fachgruppe Innere Medizin,
"Normalwerte in der Laboratoriums-
diagnostik."

Gießen, 12. u. 13.2. 1976

Opitz, H. und
Matzdorf, M. (1921)

Eine Fehlerquelle bei der Be-
stimmung der Retraktivität des
Blutkuchens.

Dtsch.med.Wschr. 47, 504 - 505

- v. Schaewen, Helga (1971) Die Morphologie der Thrombocyten bei Mensch und Tier. Literaturübersicht Berlin, 1971 Kommissionsverlag P. Parey
- Schklarewsky, A. (1868) Zur Extravasation der weißen Blutkörperchen. Pflüg. Arch.ges. Physiol. 1, 657 - 686
- Schmidt, A. (1872) Neue Untersuchungen über die Faserstoffgerinnung. Arch.ges.Physiol. 6, 413 - 538
- Schneider, G. (1955) Untersuchungen über die Abhängigkeit der 3. Phase der Blutgerinnung. Med. Diss. Bonn
- Seegers, W.H. (1965) Basic enzymology of blood coagulation. Thrombos.Diathes.haemorrh. (Stuttgart) 14, 213 - 228
- Spaet, T.H. und Cintron, J. (1965) Studies on platelet factor-3 availability. Brit.J.Haemat. 11, 269 - 275
- Thackrah, C.T. (1819) An inquiry into the nature and properties of the blood as existent in health and disease. London (Cox & Son)
cit. n. Budtz-Olsen, D.F.
- Weber, Erna (1967) Grundriß der biologischen Statistik. (6. Auflage) Stuttgart, G. Fischer Verlag.

Weber, Margarita (1969)

Untersuchungen über die Blut-
gerinnung bei Pferd und Hund.
Vet. med. Diss. München.

White, J.G. und
Krivit, W. (1966)

The ultrastructural localization
and release of platelet lipids.
Blood, 27, 167 - 186

Wright, J.H. (1906)

Die Entstehung der Blutplättchen.
Virchows Arch. path. Anat. 186,
55 - 63
cit. n. v. Schaewen, Helga.

Für die Überlassung des Themas und Anregungen bei der Auswertung der Befunde bin ich Herrn Prof. Dr. Niepage, für die theoretische und methodische Einweisung in das Arbeitsgebiet Frau Dr. Helga Bluménstein, seinerzeit Ass. Professor am Institut, zu Dank verpflichtet.

L e b e n s l a u f

Am 27. April 1943 wurde ich als Sohn des Landwirts Wilhelm R e u t e r und seiner Ehefrau Ottilie, geb. Böhringer, in Rogasen, Bez. Posen, geboren.

Von 1949 bis 1954 besuchte ich die Volksschule in Fiestel/Nordrhein-Westfalen und anschließend das Wittekindgymnasium in Lübbecke/Nordrhein-Westfalen, welches ich 1963 ohne Abschluß verließ.

Nach Tätigkeiten in mehreren Berufen und nach der Ableistung des Wehrdienstes immatrikulierte ich mich zum Sommersemester 1968 mit der kleinen Matrikel an der Pädagogischen Hochschule Berlin.

Am 13. Mai 1969 bestand ich meine Reifeprüfung beim Senator für Schulwesen in Berlin.

Vom Wintersemester 1969/70 bis zum Wintersemester 1974/75 studierte ich, mit einem Semester (6. Semester) Unterbrechung in Hannover, Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin.

Den 1. Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung legte ich in Hannover ab.

Den 2. und 3. Abschnitt an der Freien Universität Berlin.

Die Bestallung als Tierarzt erhielt ich am 16. April 1975.

